

AN 1991-041816 [06] WPIDS Full-text
DNN N1991-032163 DNC C1991-018195
TI Identifying genotype of triticeae perennial wheat grain -
by

electrophoresis, involves preparing prolamine extract from
isolated endosperm, to increase accuracy.

DC A89 C03 P13

IN AGAFONOV, A V; AGAFONOVA, O V

PA (ASIB-R) AS SIBE BOTANICAL

CYC 1

PI SU 1546022 A 19900228 (199106)*

ADT SU 1546022 A SU 1987-4346164 19871102

PRAI SU 1987-4346164 19871102

AB SU 1546022 A UPAB: 19930928

The extract is obtd. by soaking the seeds in distilled
water, subsequently removing the germ, squeezing out the
semifluid mass of endosperm, and extraction with 5-10 mkl of
extracting solution (ethanol, isopropanol). Electrophoresis
of the prolamines is carried out on gel discs of thickness
1mm. The extract is applied into the start pocket in a 0.5-
0.8 mm layer. As previously, the method involves:
preparation of prolamine extract; electrophoretical
separation of the prolamines in vertical discs of
polyacrylamide gel.

USE/ADVANTAGE - Increased accuracy in analysis of fine
grains in the identification of the genotype of Triticeae
perennial wheat in biotechnology, especially involving
labelling genetic systems with proteins. Bul.8/28.2.90
0/0

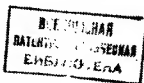


ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ
ПО ИЗОБРЕТЕНИЯМ И ОТКРЫТИЯМ
ПРИ ГНТ СССР

(51) **5 A 01 H 1/04**

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

К АВТОРСКОМУ СВИДЕТЕЛЬСТВУ



- (21) 4346164/31-13
(22) 02.11.87
(46) 28.02.90. Бюл. № 8
(71) Центральный сибирский ботанический сад СО АН СССР
(72) А.В. Агафонов и О.В. Агафопова
(53) 575.633.112.1(088.8)
(56) Созинов А.А. Полиморфизм белков и его значение в генетике и селекции. М., Наука, 1985.

(54) СПОСОБ ИДЕНТИФИКАЦИИ ГЕНОТИПОВ
МНОГОЛЕТНИХ ЗЛАКОВ ТРИБЫ ПШЕНИЦЕВЫЕ
(TRITICEAE)

(57) Изобретение относится к биотехнологии, в частности к проблеме маркирования белками генетических систем

растений и использования белковых маркеров в решении актуальных вопросов прикладной ботаники, генетики, селекции. Целью изобретения является увеличение точности анализа мелких семян многолетних кормовых злаков. Способ состоит в том, что проламини извлекаются из семян в результате замачивания зерновок в дистиллированной воде, отделения препаровальными иглами зародыша, выдавливания полужидкого эндосперма с последующей экстракцией в 5-10 мкл экстрагирующего раствора, а электрофорез осуществляется в вертикальных пластинах полиакриламидного геля толщиной 1 мм, и экстракт наносится в стартовый карман слоем 0,5-0,8 мм. 1 табл.

Изобретение относится к биотехнологии, в частности к проблеме маркирования белками генетических систем растений и использования белковых маркеров в решении актуальных вопросов прикладной ботаники, генетики, селекции.

Цель изобретения - увеличение точности анализа мелких семян.

Способ осуществляется следующим образом.

Лишенные от цветочных чешуй зерновки размачивают в дистиллированной воде в течение суток. Препаровальной иглой удаляют зародыш и выдавливают полужидкую массу эндосперма с помощью тонкого стержня, прокатывая им с вершины зерновки до ее основания. Полученный изолированный эндосперм с

массой 0,2-1 мг, отделенный от оболочек и зародыша, содержит все запасные белки без примесей, образующихся при размоле зерновки и составляющих 20-60% ее массы. Отсутствие примесей дает возможность проводить экстракцию белков в более жестких условиях в течение 12-18 ч при 40°С в 5-10 мкл 70% этанола или 50% изопропанола в герметичных микропробирках. Указанная последовательность операций позволяет провести наиболее полную экстракцию проламинальной фракции запасных белков. После центрифугирования получают 3-5 мкл концентрированного экстракта, который смешивают в соотношении 2:1 с электродным буфером электрофоретической системы, содержащим 60% сахарозы, и вторично цент-

рифугируют. Приготовленный экстракт подвергают электрофоретическому разделению в вертикальной пластине

1-миллиметрового полиакриламидного геля, при этом высокая концентрация проламиновых белков в экстракте позволяет наносить в стартовом кармане тонкий слой экстракта 0,5-0,8 мм. Таким достигается значительное повышение разрешающей способности электрофоретического метода. Ширина стартового кармана существенной роли не играет и может варьировать в пределах 3-6 мм. Термостатирование гелевой пластины в процессе электрофореза при 8-12°C позволяет повысить напряженность электрического поля до 35-37 В/см и сократить время разделения белков в пластине длиной 12 см до 2,5 ч. Способ позволяет проводить индивидуальный анализ мелких зерновок многолетних кормовых злаков с массой менее 5 мг для идентификации сортов и видов, экотипов и форм. Кроме того, появляется возможность анализировать электрофоретические спектры проламинов у гербарных образцов, собранных десятки лет назад, что становится необходимым при установлении филогенетических взаимоотношений. Размачивание зерновок в дистиллированной воде, удаление препаровальной иглой зародыша и выдавливание с помощью тонкого стержня полужидкой массы эндосперма обеспечивает анализ индивидуальных зерновок малых размеров. Полученный таким способом изолированный эндосперм, содержащий все запасные белки без примесей, пригоден для экстракции и дальнейших процедур, связанных с разделением белков в модифицированной электрофоретической системе.

Способ иллюстрируется следующими примерами.

Пример 1. Имеются семена кормового злака пырейника новозанглийского (пырей бескорневищного) сорта "Первомайский" и образцы семян из природных популяций двух таксономических видов рода пырейник (п. шероховатостебельный и п. новозанглийский), различающихся незначительным морфологическим признаком (степень опушенности колоскового членика). Предварительный морфологический анализ сортовых семян показывает, что среди них часть следовало бы отнести к одному

виду, а часть - к другому, а также выделить ряд промежуточных форм с неясной видовой принадлежностью.

В опыте ставится задача сравнить проламиновые спектры двух таксономических видов, каждый из материала сорта "Первомайский" и из двух отделенных мест дикого произрастания с тем, чтобы оценить правильность разделения указанных видов на основе незначительных морфологических отличий.

Выборки зерновок из каждого указанного в таблице образца после отделения цветочных чешуй помещались в водяные камеры на 24 ч.

Кроме того, для объективного сопоставления электрофоретических спектров, полученных в серии опытов, в качестве стандартного маркера анализируются по 2 зерновки пырейника сибирского с известным компонентным составом спектра.

С размоченных зерновок удаляют избыток воды фильтровальной бумагой, препаровальной иглой отсекают зародыш и через отверстие в обложке выдавливают противожидкий эндосперм, промывая с противоположного конца зерновки тонким стержнем из нержавеющей стали. Этот же стержнем изолированный эндосперм, состоящий из пырея бескорневищного 0,3-0,6 мг, помещают в полиэтиленовую микропробирку с 8 мкл 50% изопропанола, гомогенизируют, закрывают герметичной пробкой и помещают в термостат с температурой 40°C на 12-15 ч. По истечении времени микропробирку охлаждают до комнатной температуры, взмучивают осадок тупой иглой и центрифугируют 5 мин при 12000 g. Супернатант по возможности полностью отсасывают микропипеткой и смешивают в соотношении 2:1 с алюминий-лактатным буфером pH 3,1, содержащим 60% сахарозы и краситель пиронин, после чего образцы вторично центрифугируют 15 мин при 12000 g.

Для электрофоретического разделения проламинов применяют однородную гелево-буферную систему с вертикальными пластинками 1-миллиметрового 9%-ного полиакриламидного геля на алюминий-лактатном буфере pH 3,1. Одновременно анализируются 24 пробы, которые наносят под слой электропроводного буфера в количестве 2 мкл. Электрофорез проводят при напряжении

440 в течение 2,5 ч, охлаждая гелевую пластину наладными оргстеклянными холодильниками с циркулирующей водой при 10-12°C. Гели фиксируют в 12%-ной трихлоруксусной кислоте (ТХУ) и окрашивают 0,1%-ным красителем Кумасси - 250 мл. в 12% ТХУ в течение 18-20 ч, не снимая со второго стекла. Окрашенные гели дифференцируют 7%-ной уксусной кислотой и фотосграфируют в проходящем свете.

В спектрах изученных образцов пырейника присутствует от 13 до 19 компонентов разной интенсивности. При этом около половины компонентов с определенной частотой встречается во всех изученных природных и сортовых образцах.

Ряд компонентов распределен случайным образом, независимо от морфологии колоскового членика, некоторые компоненты спектра характерны только для определенного природного экотипа.

На основании ранее установленных закономерностей распределения проламиновых компонентов у дикорастущих злаков пшеничной трибы можно считать, что представители разных биологических видов не могут иметь в составе проламиновых спектров идентичные совокупности компонентов. Таким образом, все изученные образцы пырейника следует отнести к одному виду - пшероватостебельный.

Пример 2. Имеется партия семян многолетнего кормового злака пшеницовой трибы с утерянными сортовыми свидетельствами. В состав пшеницовой трибы входит 9 родов многолетних злаков, включая важные в кормовом отношении, такие как пырей, пырейник, житняк, колосняк, ломкоколосник и т.д. Сходное строение зерновки позволяет применять списанную методику идентификации компонентов проламкина, (преобладающего запасного белка зерновки), основанную на предлагаемом способе, как единую для всех

представителей трибы. Для точного определения сортовой принадлежности необходимо провести электрофоретическое разделение белкового экстракта эндосперма серии семян неизвестного образца и полученные спектры сравнить с аналогичными спектрами известных сортов.

Таким образом, предлагаемый способ дает возможность провести паспортизацию существующих сортов кормовых злаков трибы пшеницевые, а также контролировать все этапы селекционного процесса, апробации и районирования при создании новых хозяйственно ценных форм, значительно снизив экономические затраты на многие процедуры, позволяет достоверно анализировать природные экотипы дикорастущих пшеничных злаков, представляющих большой интерес для интродукции, а также идентифицировать гербарные образцы, содержащие семена (независимо от сроков хранения), в целях уточнения внутри- и межвидовых филогенетических связей в трибе.

Ф о р м у л а и з о б р е т е н и я

Способ идентификации генотипов многолетних злаков трибы пшеницевые (*Triticaceae*), включающий приготовление экстракта проламинов, электрофоретическое разделение проламинов в вертикальных пластинах полиакриламидного геля, отличающийся тем, что, с целью увеличения точности анализа мелких семян, экстракт проламинов готовят из изолированного эндосперма, полученного путем размачивания семян в дистиллированной воде с последующим удалением зародыша, выдвливанием полужидкой массы эндосперма и экстракцией в 5-10 мл экстрагирующего раствора, а электрофорез проламинов проводят на пластинах геля, толщиной 1 мм с нанесением в стартовый карман экстракта слоем 0,5-0,8 мм.

Таксономический вид	Место сбора, год	Количество зерновок	Примечание
П. шероховатосте- бельный	Владивосток, 1986	22	Природные популяции
П. Новоанглийский	Владивосток, 1986	22	То же
П. шероховатосте- бельный	Новосибирск, 1986	22	"--"
П. Новоанглийский	Новосибирск, 1986	22	"--"
П. шероховатосте- бельный	Получен из Омского СИБНИСХ03а, 1987	22	Отобраны из семян пырея из бескорне- виного сорта "Первомайский"
П-новоанглийский	То же	22	То же
Промежуточная форма	"--"	12	"--"

Редактор М. Недолуженко	Составитель В. Демкин Техред И. Сердюкова	Корректор С. Черни
Заказ 33	Тираж 432	Подписное
ВНИИПИ Государственного комитета по изобретениям и открытиям при ГКНТ СССР 113035, Москва, Ж-35, Раушская наб., д. 4/5		
Производственно-издательский комбинат "Патент", г. Ужгород, ул. Гагарина, 101		